

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08706

研究課題名(和文) 骨格筋・血管関連の概念の応用による血管石灰化治療とその分子機構の究明

研究課題名(英文) Treatment for vascular calcification by focusing on the interplay among blood vessel/heart, bone, and skeletal muscle

研究代表者

山田 俊輔 (Yamada, Shunsuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10419608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨・血管・骨格筋関連の障害により、骨量減少、サルコペニア、そして血管石灰化を同時に呈する慢性腎不全マウスモデルを完成し、リン酸代謝に関係するXPR1が慢性腎不全下では骨格筋および血管においてその発現量が減少すること、培養ヒト血管平滑筋細胞を用いた実験において、XPR1の欠乏が血管石灰化を促進することを実証し、腎不全に伴って上昇するPTHやFGF23がXPR1の発現を負に制御していることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、慢性腎臓病患者では骨・血管・骨格筋関連が乱れ、その結果、骨粗鬆症、血管石灰化(動脈硬化)、サルコペニアが共時的に進行すること、さらにリン酸代謝に関係するXPR1が骨格筋におけるマイオカインの低下に伴って血管や骨格筋で低下することが関係していることが示された。このことは、運動などによってサルコペニアを予防すれば、続発する骨障害や血管石灰化や予防できる可能性を示している。また、骨・血管・骨格筋の密接な連携に介入する治療法の開発が骨粗鬆症、サルコペニア、動脈硬化を防いで活力ある高齢化社会の創出につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have found the following four main results. First, we have established a mouse model of chronic kidney disease (CKD) which develops decreased bone volume, sarcopenia, and vascular calcification by disturbing the blood vessel/heart-bone-skeletal muscle axis. Second, we have demonstrated that XPR1, which is related to cellular phosphate metabolism, is decreased in the skeletal muscle and vasculature of CKD mice. Third, in the cultured human vascular smooth muscle cells, XPR1 deletion aggravated calcification of the extracellular matrix. Forth, PTH and FGF23, which elevate in response to declining kidney function negatively regulate XPR1 expression in the vascular smooth muscle cells.

研究分野：慢性腎臓病、CKD-MBD、血管石灰化、PEW

キーワード：慢性腎臓病 血管石灰化 サルコペニア 骨粗鬆症 骨血管関連 骨格筋血管関連

1. 研究開始当初の背景

CKD (chronic kidney disease)は国民の約 10%が罹患する疾患で、生命予後が悪く、社会経済的に大きな負荷となっている。血管石灰化は、カルシウム(Ca)とリンの複合体が動脈に沈着する病態で、CKD 患者ではその頻度が高い。血管石灰化は、冠動脈疾患や心不全などの心血管疾患のリスクを上昇させ、CKD 患者の生命予後を悪化させる。しかし、血管石灰化の有効な治療方法はいまだ見つかっていない。

サルコペニアは、加齢に伴う骨格筋量の低下とそれに伴う筋力や身体機能の低下を表す概念で、ADLの低下を来し、生命予後をも悪化させる。CKD では、様々な機序によってサルコペニアが高頻度かつ高度である。近年、骨格筋が分泌する myokine の中には、血管に受容体を有するものがあり、血管の機能や構造に影響することが報告された。CKD ではサルコペニアの合併によって myokine が減少するために、血管平滑筋細胞の形質変化が促進されて、血管石灰化のリスクが高まっている可能性がある。逆に、骨格筋から分泌されたこれらの myokine は血管平滑筋細胞を収縮型に維持することによって、血管が石灰化するのを防ぐポテンシャルを有していることが期待される。

さらに、血管や骨格筋におけるリン酸代謝において XPR-1 が重要であることが明らかになりつつある。XPR-1 は細胞のリン酸を体外に排泄する機能を有しているとされており、細胞内のリン酸量を調整する役割を担っている可能性がある。XPR-1 の発現量が、骨格筋が産生する myokine によって調整されているとすれば、myokine の血管および骨格筋の保護効果は XPR-1 によって直接制御されている可能性がある。

以上より、『CKD に伴う骨格筋量の減少は、骨格筋における myokine の減少を介してリン酸代謝を司る XPR-1 の発現量を変化させることによって血管石灰化を促進し、骨格筋・血管相関の概念を応用して骨格筋量の増加を図る治療介入を施せば、血管石灰化を抑制できるのではないか』という学術的問いを立て、この問いに立脚した今回の研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、骨格筋と血管の間に myokine を介したクロストークが存在し、myokine をターゲットにした治療介入することが血管石灰化の治療につながることを CKD マウスを用いた動物実験と培養血管平滑筋細胞などを用いた基礎実験によって示すことである。

3. 研究の方法

(1)マウスへの CKD の誘導方法

慢性腎臓病(CKD)の誘導方法として、ラットの CKD モデルとして既に確立されているアデニン腎症モデルを使用した。我々は予備実験によって餌中のアデニンの濃度を 0.1-0.3%の範囲では、0.2%のアデニンを含有した餌が最も安定して高度の CKD を誘導できることを確認し、今回の実験に用いるアデニン含有量を 0.2%に設定した。さらに、アデニン含有餌の給餌を開始する 1 週間前に、吸入麻酔下で左腎摘出術を追加した。

(2)マウスの実験プロトコール

CKD モデルを評価するために、コントロール(CNT)群として、全身麻酔下で偽手術を行ったマウスにアデニンを含有しない通常餌を給餌する群を並列飼育した。CNT 群と CKD 群のマウスは、2 週、4 週、6 週、8 週間飼育して、安楽死させた。安楽死に際して血液、大動脈、骨、骨格筋などの臓器を摘出した。さらに、リンの負荷量が血管および骨格筋に及ぼす影響を検討するために、CKD 群を 3 群に分けて低リン(0.3%)食群、正常リン食(0.6%)群、高リン食(1.2%)群を設定した。アデニン含有食を開始して 8 週後に安楽死させ、臓器を摘出した。

(3) 培養細胞を用いた石灰化抑制実験

ラットの培養血管平滑筋細胞である A7r5 細胞を使用した。培地中の無機リン濃度は 3.5 mM、Ca 濃度は 2.5 mM とした。コントロールの培地は、無機リン濃度は 1.0 mM、Ca 濃度は 1.0 mM とした。石灰化を誘導するためのリン負荷期間は 7-14 日とした。リン酸バッファーで洗浄したあとに 0.6N の塩酸で 24 時間処理し、Ca 含量を測定した。また NaOH で処理した後に BCA protein assay で蛋白含量を定量し、石灰沈着量は Ca 含量/蛋白量として計算

した。また、培養血管平滑筋細胞を CRISPR-Cas9 のシステムを用いて、XPR-1 の発現量を極度に低下させた場合の、リンによる Ca 沈着量(血管石灰化)などを wild-type マウス群と比較した。

4. 研究成果

(1) アデニン腎症マウスの腎障害および血清パラメータの評価

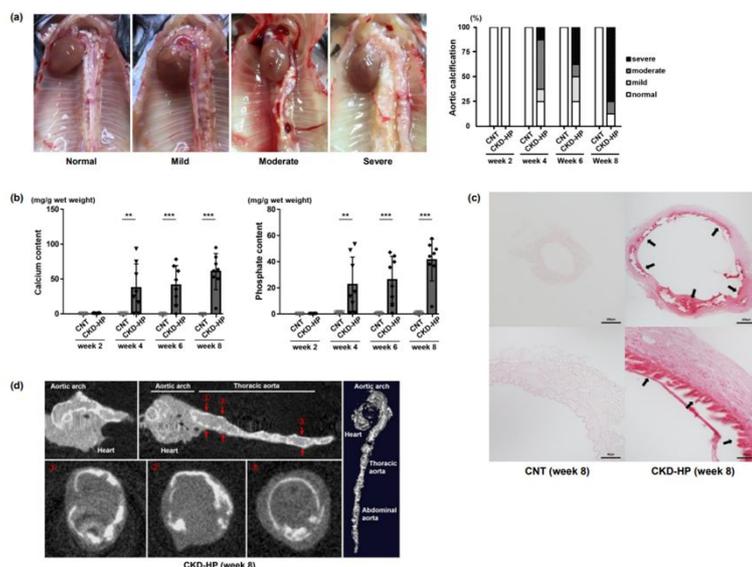
CKD 群では、CNT 群と比較して、週数が進むごとに腎機能の指標としての血清尿素窒素、クレアチニン、シスタチン C 濃度が上昇し、腎機能が進行性に低下するモデルであることが示された。さらに腎機能の低下とともに、血清リン濃度が上昇し、血清マグネシウム濃度が上昇傾向であった。また、8 週目で比較すると、CKD 群のマウスは、CNT 群と比較して血清 PTH 濃度と血清 FGF23 濃度が著明に上昇した。

さらに、8 週目の腎組織に Masson-Trichrome 染色を施して腎臓の線維化を観察した場合、CNT 群の腎臓には線維化を認めなかったが、CKD 群では広範囲に腎間質の線維化を認めた。また、CKD 群の尿細管腔内にはアデニン結晶の沈着を認めた。本モデルはヒトの進行性腎障害のモデルとして有用である可能性が示唆された。

(2) アデニン腎症マウスにおける石灰化の評価

CNT 群のマウスは大動脈の石灰化を全く認めなかったが、CKD 群では、第 4 週目から一部のマウスにおいて大動脈の石灰化を認め、第 8 週ではほぼすべてのマウスの大動脈に中等度から高度の石灰化を認めた(図 1a)。

予測どおり、CKD 群のマウスの大動脈 Ca 含量は、CNT 群と比較した場合に第 4 週目から有意に増加し、第 8 週目に最大に達した(図 1b)。一方、CNT 群のマウスの大動脈中の Ca 含量は時間が経過しても全く増加しなかった。摘出した石灰化動脈を Alizarin Red 染色で処理した場合、大動脈中膜に結晶構造を認めた(図 1c)。また、摘出した石灰化大動脈を小動物用 μ CT で撮影したところ、全周性の血管石灰化を大動脈弓部から腹部大動脈にかけて広範囲に認めた(図 1d)。さらに、胸部大動脈から抽出した RNA を RT-PCR で評価したところ、CNT 群と比較して、CKD 群は RUNX2、osteopontin、TNF- α 、PiT-1 の遺伝子発現が第 8 週で有意に増加し、逆に α -SMA と XPR-1 の遺伝子発現は有意に低下した。すなわち、CKD の進行とともに大動脈における血管平滑筋の形質は収縮型から石灰化形質へ変化したと考えられた。

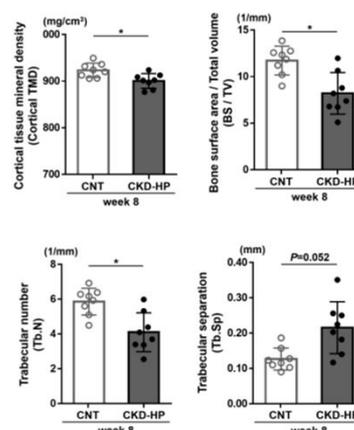


(3) アデニン腎症マウスにおける骨の評価

脛骨を小動物用 μ CT で撮影し、三次元解析によって骨静的パラメータを算出した。腎不全導入後 8 週の CNT 群と CKD 群を比較した場合、CKD 群では骨量、骨表面積、そして骨梁数が有意に減少し、骨梁間の距離が拡大することが明らかとなった(図 3)。

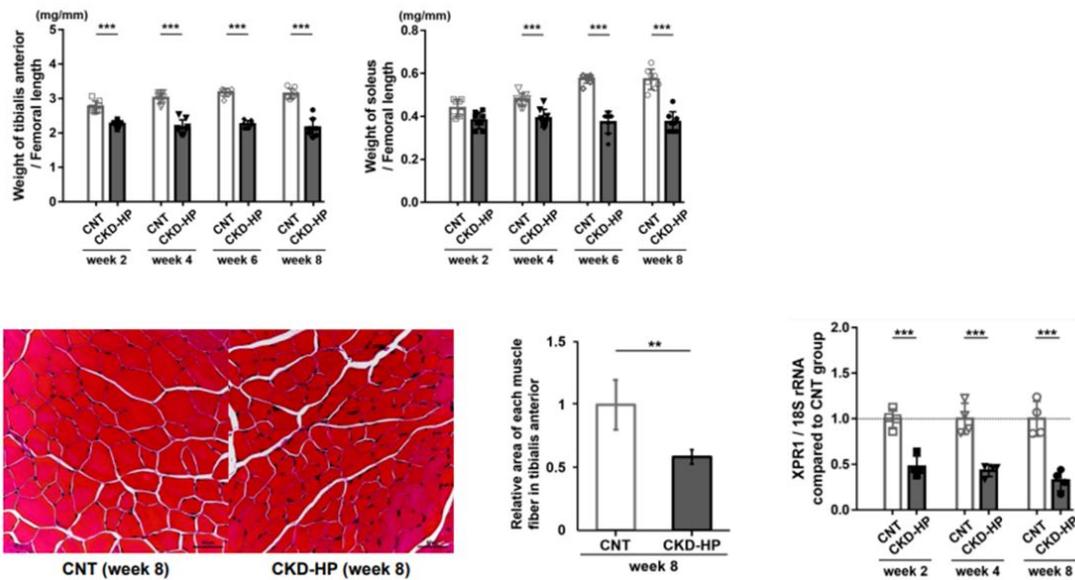
(4) アデニン腎症マウスにおける骨格筋の評価

骨格筋の指標として解析した前脛骨筋とヒラメ筋は、CKD 群において第 2 週目から有意に減少し、第 8



週目まで一貫して有意に減少していた(図 4)。第 8 週目で採取した前脛骨筋の Hematoxylin-Eosin 染色では、骨格筋径が CKD 群において有意に減少した(図 4)。さらに、リン酸代謝と密接な関係がある XPR-1 遺伝子が、第 2 週目から有意に減少し、第 8 週目まで一貫して低下していることが示された(図 4)。

また、アデニン腎症マウスモデルの骨格筋における myokine の遺伝子発現量を検討した。myokine のひとつである irisin の発現量は CNT 群よりも低下していた。骨格筋で産生されるその他の myokine も CKD によって増減することが明らかになった。



(5) リン負荷量が骨・血管・骨格筋におよぼす影響

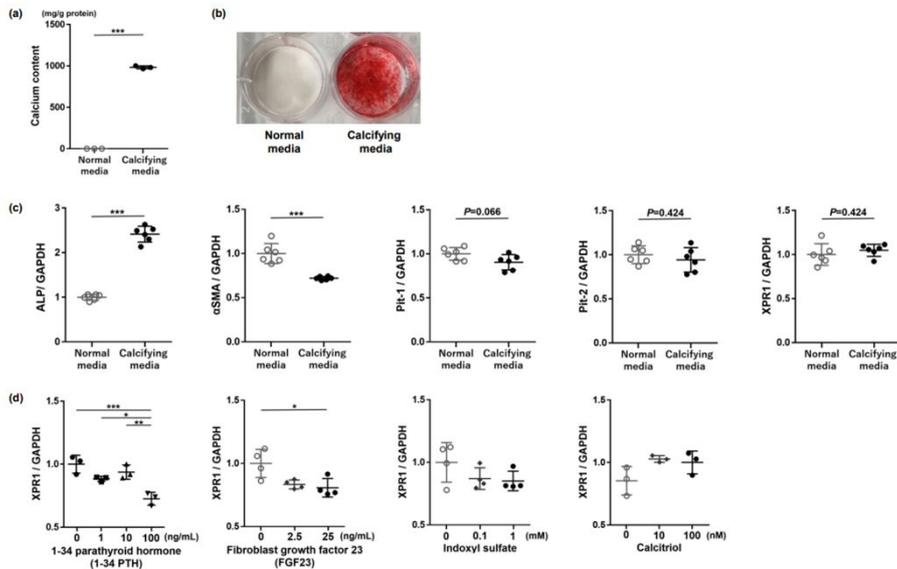
次に、リン負荷量が骨・血管・骨格筋に及ぼす影響を評価した。まず、リン負荷量が少なくなると、血清尿素窒素、クレアチニン、シスタチン C 濃度はいずれも減少し、腎機能は悪化することが明らかになった。また、リン負荷量が減ると血清 Ca 濃度が増加し、血清リン濃度は低下することが明らかになった。リン利尿ホルモンである血清 PTH 濃度はリン負荷量が多い群で著増したが、逆に血清 FGF23 濃度はリン負荷量が少ない群で著増した。

腎組織に対して Masson-Trichrome 染色を行って線維化を評価すると、リン負荷量が少ない群で線維化が高度であった。一方、リン負荷量が多い群では大動脈中の Ca とリンの含量が有意に高値であった。

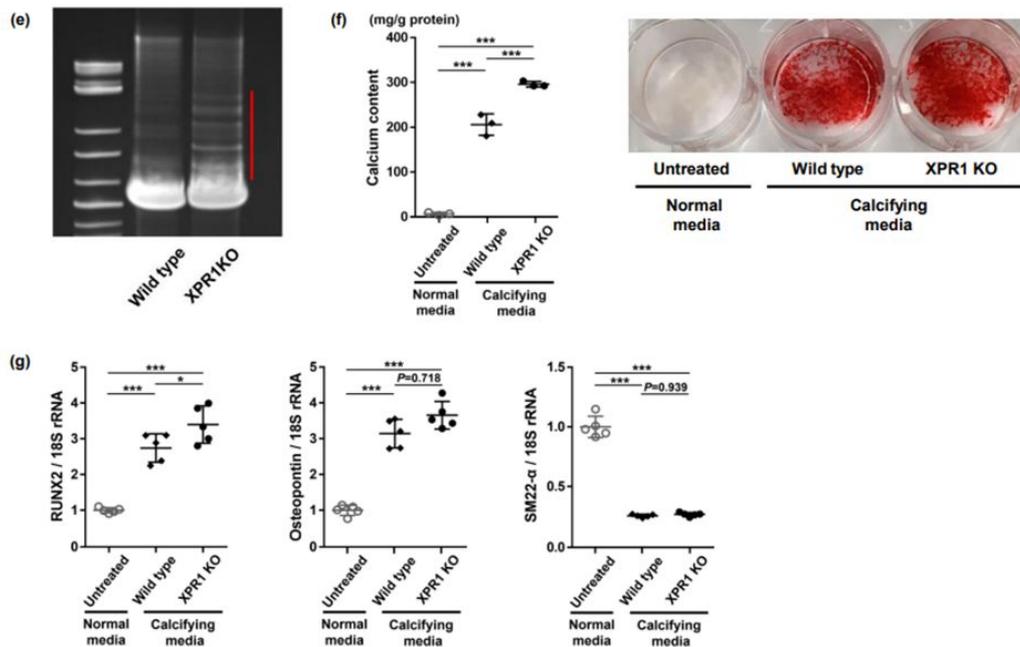
さらに、大動脈の遺伝子変化を比較すると、リン負荷量が増大すると RUNX2、オステオポンチン、TNF- α の発現が有意に増加し、一方、 α -SMA と XPR-1 の発現量はリン負荷量で有意に減少した。

(5) 培養血管平滑筋細胞を用いた実験系

培養血管平滑筋細胞を用いた実験系において、リンと Ca を高濃度に含む石灰化培地に血管平滑筋細胞を曝露すると細胞外マトリックスへの Ca 沈着量が増加し、Alizarin Red 染色において赤色に染色される領域が有意に広範囲であった(図 5)。また RT-PCR を用いた遺伝子発現量については、ALP の発現量は増加し、 α -SMA の発現量は減少したが、XPR-1 の遺伝子発現量には有意な変化を認めなかった(図 5)。さらに、XPR-1 の発現量を変化させる要因を同定する目的で、PTH と FGF23 を負荷したところ、PTH と FGF23 はともに XPR-1 の遺伝子発現量を有意に減少させていた(図 5)。



最後に、CRISPR-Cas9 システムを用いて XPR-1 をノックダウンした培養血管平滑筋細胞は、wild-type と比較して有意に細胞外マトリックスへの Ca 沈着量が増加し、さらに骨芽細胞様細胞への形質変化の指標である RUNX2 が有意に増加した(図 6)。このことは、XPR-1 が血管平滑筋細胞の形質変化を抑制することによってリン負荷に伴う血管石灰化に対して抑制的な作用を持つことを示唆している。さらに追加で行った実験において、リン負荷によって培養骨芽細胞における irisin の遺伝子発現量が減少すること、irisin の培養血管平滑筋細胞への投与は XPR-1 の発現量を低下させる可能性が明らかになった。



今回、科研費の助成を受けて行った実験において、(1) 8 週間という非常に短期間で C57BL6 マウスに進行性の腎障害を誘導し、血管石灰化、骨量減少、さらにサルコペニアを引き起こし、骨・血管・骨格筋相関を調べることができる CKD マウスモデルを確立することに成功し、(2)リン代謝因子である XPR-1 が CKD マウスの血管と骨格筋で減少し、CKD マウスの骨格筋で減少する irisin が血管における XPR-1 の発現調節に関与している可能性があること、さらに XPR-1 が血管石灰化を抑制する物質であることを明らかにした。

今後、irisin を CKD マウスに投与することによって、血管および骨格筋における XPR-1 の発現量を変動させ、その結果、マウスの血管石灰化、サルコペニア、さらには骨量減少を改善できるかどうかを検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arase Hokuto, Yamada Shunsuke, Torisu Kumiko, Tokumoto Masanori, Taniguchi Masatomo, Tsuruya Kazuhiko, Nakano Toshiaki, Kitazono Takanari	4. 巻 110
2. 論文標題 Protective Roles of Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1 (XPR1) in Uremic Vascular Calcification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 685 ~ 697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-022-00947-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒瀬北斗、山田俊輔
2. 発表標題 C57BL/6マウスを用いた血管石灰化モデルの作製と尿毒症性血管石灰化におけるXPR1の役割の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会 学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 敏昭 (Nakano Toshiaki) (10432931)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	鳥巢 久美子 (Torisu Kumiko) (20448434)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------